

ANALYSE VON
KRAS-MUTATION, KOPIENANZAHL UND NUMERISCHEN
VERÄNDERUNGEN DER CHROMOSOMEN 4,10 UND 12
BEIM KOLOREKTALEN KARZINOM

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Kristin Beyer

geboren am 17. Mai 1991 in Weimar

Gutachter (akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort)

1. Prof. Dr. Iver Petersen, Jena
2. PD Dr. Ignacio Rubio, Jena
3. Prof. Dr. Holger Bastians, Göttingen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.11.2016

Abkürzungsverzeichnis

BRAF	V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B
CEN	Centromer
CIN	Chromosomal Instability
CRC	Colorectal Carcinoma
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FS	Folinsäure
5-FU	5-Fluoruracil
GAP	GTPase Activating Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor
GNAS1	Adenylate Cyclase Stimulating G-alpha Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
MAP-Kinase	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	MAP Kinase Kinase
MET	Hepatocyte Growth Factor Receptor (c-Met)
MIN	Microsatellite Instability pathway
MSI	Microsatellite Instability
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDCD4	Programmed Cell Death Protein 4
PI3K/Akt	Phosphoinositid 3 Kinase/Proteinkinase B

PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RASCAL II	Kirsten Rat Mutations in Patients with Colorectal Cancer Study
ROS	Reactive Oxygen Species
TMA	Tissue Microarray
TNM	TNM Staging System of malignant tumors
TP53	Tumor Protein 53
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung.....	8
2.1 Kolorektales Karzinom	8
2.1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms.....	8
2.1.2 Ätiologie und Pathogenese	8
2.1.3 Therapie des kolorektalen Karzinoms	9
2.2 KRAS	10
2.3 Aneuploidie	11
3. Ziele der Arbeit.....	13
4. Publierte Originalarbeit.....	14
5. Diskussion.....	20
5.1 Einordnung des Patientenkollektivs nach klinisch-pathologischen und demographischen Kriterien	20
5.1 KRAS und Überleben	22
5.2 Auswertung der Sequenzprofile	22
5.3 Aneuploidie und Überleben	25
5.4 Verlust von Chromosom 10 als Marker für Tumorprogress und vermindertes Überleben	26
6. Schlussfolgerungen.....	28
7. Literatur- und Quellenverzeichnis	30
8. Anhang.....	34
8.1 Ehrenwörtliche Erklärung	34
8.2 Danksagung.....	35
8.3 Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Zusammenfassung

Für das Jahr 2014 wurden auf Basis der 2010 vom Robert-Koch-Institut veröffentlichten Daten bis zu 64.000 Neuerkrankungen am kolorektalen Karzinom (KRK) prognostiziert (Robert-Koch-Institut 2013). Damit steht das KRK bei Frauen an zweiter bzw. bei Männern an dritter Stelle aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland (Robert-Koch-Institut 2013). Trotz sinkender Mortalität durch verbesserte Früherkennung und Therapie sollte gerade aufgrund des demographischen Wandels und des vermehrten Auftretens von Folgeerscheinungen westlicher Lebensweise intensiv nach Hintergründen der Karzinogenese und neuen therapeutischen Ansätzen geforscht werden. Die vorliegende Arbeit soll dazu einen Beitrag leisten, indem die Auswirkungen von KRAS-Mutation, KRAS-Genkopienanzahl und Ploidie auf das Tumorverhalten und die Prognose des KRK untersucht wurden. Dazu wurden insgesamt 52 Tumorproben mittels Sanger-Sequenzierung auf KRAS-Mutationen untersucht und die Ploidie mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bestimmt. Von besonderem Interesse waren dabei die Chromosomen 4 und 10, deren Anzahl als Surrogatmarker für die Ploidie diente, sowie Chromosom 12, welches auf seinem kurzen Arm das KRAS-Gen beherbergt.

KRAS ist ein Proto-Onkogen und kodiert für ein sogenanntes kleines G-Protein, welches eine entscheidende Rolle bei der Signalvermittlung des EGF-Rezeptors spielt. Der EGFR-RAS-RAF-MAP-Kinase-Signalweg steuert unter anderem die Zellproliferation, -migration und -adhäsion und ist damit essentiell für Tumorentstehung und Tumorwachstum. Im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz kommt es zur Akkumulation von Mutationen in Proto-Onkogenen, wie dem KRAS-Gen, und Tumorsuppressorgenen, sowie zur genomischen Instabilität. Der Begriff der Aneuploidie bezeichnet eine veränderte Anzahl oder strukturelle Veränderungen der Chromosomen, welches in der Literatur häufig mit einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung und höherer Mortalität einhergeht.

Die Daten zu KRAS-Kopienanzahl, KRAS-Mutation und Ploidie wurden mit klinisch-histopathologischen Parametern korreliert. Die Auswertung zeigte eine schlechte Prognose hypodiploider Tumoren im Vergleich zu euploiden und hyperdiploiden Tumoren. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt, wenn Chromosom 10 betroffen war.

Insgesamt zeigten aneuploide Tumoren eine Tendenz zu einem schlechteren Überleben, wenn auch nicht signifikant. Bezüglich der KRAS-Mutation konnten wir keine Assoziation zu Ploidiestatus, Gesamtüberleben oder einem vermehrten Vorkommen von Metastasen feststellen. Allerdings zeigte sich eine höhere Rückfallrate R0-resezierter Fälle beim Vorliegen einer vermehrten Anzahl des KRAS-Gens. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Als beste Prädiktoren für das Gesamtüberleben im Patientenkollektiv erwiesen sich die vollständige (R0-) Resektion des Tumors ($p < 0,001$), das Vorliegen von low-grade Tumoren ($p = 0,042$) und das initiale Fehlen von Metastasen ($p = 0,002$).

Bezüglich der Auswirkungen der KRAS-Mutation und der Aneuploidie auf das Überleben beim kolorektalen Karzinom gibt es in der derzeitigen Forschung widersprüchliche Ergebnisse und es bedarf weiterer Untersuchungen. Das schlechte Überleben von Patienten mit einem Verlust von Chromosom 10 könnte durch den Verlust mehrerer Tumorsuppressorgene wie zum Beispiel PTEN oder PDCD4, welche beide auf Chromosom 10 liegen, begründet sein. Dies könnte möglicherweise zur Etablierung des Chromosoms 10 als prädiktiven Marker bezüglich Tumorprogress und hoher Mortalität führen. Insgesamt ist die Beschränkung auf die KRAS-Mutation als einzigen prädiktiven Marker in der Therapieplanung beim KKR nicht mehr zeitgemäß. Andere molekulare Marker wie zum Beispiel PTEN, BRAF, EGFR und der Ploidiestatus sollten als prädiktive Faktoren weiter untersucht und als Marker für Tumorprogress und im Rahmen der Therapieentscheidung validiert werden.

2. Einleitung

2.1 Kolorektales Karzinom

2.1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

In Deutschland erkranken derzeit jährlich etwa 60.000 Menschen neu an einem kolorektalen Karzinom. Beim Mann sind Prostata- und Lungenkarzinom häufiger, bei der Frau nur das Mammakarzinom. In Hinsicht auf die Sterblichkeit liegt das KRK beim Mann an zweiter und bei der Frau an dritter Stelle (Robert-Koch-Institut 2013).

Die Inzidenz ist seit 1980 stetig gestiegen und sinkt aktuell auf das Alter bezogen leicht ab. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 75 und für Männer bei 71 Jahren. Insgesamt steigt die Inzidenz ab einem Alter von 50 Jahren deutlich an. Vom Beginn der 1980er bis 1990er Jahre an sinkt die Mortalität kontinuierlich. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit bei 64% mit einer im Vergleich zum Rektumkarzinom leicht besseren Prognose für Kolontumoren (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e.V. 2014).

Weltweit gesehen sinkt die Mortalität in den Industrieländern wie den USA, Australien, Neuseeland und dem Großteil der westeuropäischen Staaten, was die besseren Therapiemöglichkeiten und frühzeitigere Erkennung durch landesweite Screeningprogramme widerspiegelt. In den wirtschaftlich aufstrebenden Staaten Südamerikas, Osteuropas und Asiens scheint die Mortalität des KRK jedoch sogar zu steigen. Die Auswirkungen der Annahme westlicher Lebens- und Ernährungsweise in diesen Ländern werden durch das Fehlen von Screeningprogrammen und frühzeitigen Interventionsmethoden aggraviert. So stieg beispielsweise die auf das kolorektale Karzinom bezogene Mortalitätsrate brasilianischer Männer im Zeitraum von 1985 bis 2004 um 1,96% jährlich (Center et al. 2009).

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Entstehung des KRK unterliegt einem mehrstufigen Prozess, der sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz. Ausgehend von benignen Adenomen der Darmschleimhaut bilden sich invasive Karzinome mit der Fähigkeit der Metastasierung. Die Tumorentwicklung wird dabei sowohl durch eine Anhäufung von Mutationen in

Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen als auch durch die Entstehung chromosomaler Instabilität gekennzeichnet.

Als Risikofaktoren für sporadische KRK gelten neben familiärer Belastung eine geringe körperliche Aktivität, Übergewicht, Nikotin- und Alkoholkonsum, chronisch entzündliche Darmerkrankungen sowie eine ballaststoffarme und fleischreiche Ernährung. Die Ausschaltung bzw. Beherrschung dieser Risikofaktoren durch primäre Prävention und Aufklärung stellt eine große Herausforderung an unsere Gesellschaft dar. Die verhältnismäßig leicht zugängliche Lage der meisten Kolontumoren erlaubt weiterhin effektive Maßnahmen der sekundären Prävention durch ein Screening ab dem 50. Lebensjahr mit Hilfe des Guajak-Tests auf okkultes Blut im Stuhl, Sigmoidoskopie und vollständige Koloskopie. Von allen Maßnahmen der Früherkennung besitzt die vollständige Koloskopie als Goldstandard die höchste Sensitivität und Spezifität und kann darüber hinaus durch Abtragung von Adenomen die Entstehung eines KRK wirkungsvoll verhindern (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2014).

2.1.3 Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms ist komplex und sollte im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz geplant werden (MacDermid et al. 2009). Maßgeblich für die Therapieentscheidung ist dabei das Staging, d.h. die Bestimmung von Ausdehnung des Primärtumors (T), des Lymphknotenstatus (N) und des Vorhandenseins von Fernmetastasen (M). Das kolorektale Karzinom ist einer der wenigen Tumoren, bei dem eine kurative Therapie selbst bei Vorhandensein von Fernmetastasen möglich sein kann (Adam et al. 2012). Bei Kolonkarzinomen ohne primäre Fernmetastasen erfolgt in der Regel eine onkologische Resektion, welche besonders im UICC Stadium III durch eine adjuvante Chemotherapie ergänzt werden sollte (Klein et al. 2015). Beim Rektumkarzinom sollte die Möglichkeit einer neoadjuvanten Radiochemotherapie vor Tumorresektion geprüft werden. In Einzelfällen kann hier nach der neoadjuvanten Therapie sogar auf eine Operation verzichtet werden (Araujo et al. 2015).

Als Ergänzung zu Radiotherapie, Chemotherapie und chirurgischer Resektion hat die Entwicklung von Antikörpern gegen EGFR und VEGF die Therapiemöglichkeiten entschieden erweitert. Der Antikörper Bevacizumab (Handelsname Avastin®, Hersteller Roche) ist laut der S3 Leitlinie Kolorektales Karzinom zusammen mit 5-FU/FS mit oder

ohne Irinotecan als Erstlinientherapie zugelassen. Bevacizumab fängt den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ab, bevor dieser an seinen Rezeptor binden und damit die Tumorangiogenese fördern kann. Die Antikörper Cetuximab (Handelsname Erbitux®, Hersteller Merck KGaA) und Panitumumab (Handelsname Vectibix®, Hersteller Amgen) blockieren den Epidermal Growth Factor- (EGF-) Rezeptor, welcher in ca. 80% der Tumorzellen überexprimiert ist (Li et al. 2015) und Zellwachstum, Zellwiederaufbau sowie Metastasierung fördert. Der chimäre Antikörper Cetuximab ist in Deutschland in Verbindung mit einer irinotecanhaltigen Therapie bei Patienten mit KRAS-Wildtyp als Erstlinientherapie zugelassen und kommt auch in Zweit- und Drittlinientherapien besonders nach Irinotecanversagen zur Anwendung. Der vollständig humanisierte Antikörper Panitumumab kommt bisher nur als Drittlinientherapie nach Versagen von Fluoropyrimidin-, Oxaliplatin- und irinotecanhaltigen Regimen zum Einsatz.

2.2 KRAS

Das KRAS-Gen kodiert für ein kleines G-Protein, welches eine Schlüsselrolle im EGFR-MEK-MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg spielt. Über diesen Signalweg werden vor allem Signale zur Zellproliferation, -migration und -adhäsion vermittelt. Das KRAS-Gen gehört zur Familie der ras-Onkogene und befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12 (12p.12.1). KRAS selbst wird infolge der Aktivierung des EGF-Rezeptors über Austausch von GDP zu GTP aktiv und vermittelt das Signal an nachfolgende Proteine wie zum Beispiel MEK und MAP-Kinase. Nach einiger Zeit tauscht die intrinsische GTPase das GTP gegen GDP aus und KRAS wird inaktiv. Der GTP-bindende Zustand wird dabei durch kleine Proteine, sogenannte GEFs (guanine nucleotide exchange factors) und GAPs (GTPase activating proteins) reguliert (Hennig et al. 2015). Als Folge von sogenannten „gain of function“-Mutationen entfällt die intrinsische GTPase-Aktivität und KRAS bleibt unabhängig vom EGF-Rezeptor aktiv; das Wachstumssignal wird also in der Zelle selbst generiert. In seiner Schlüsselposition wird KRAS außerdem durch die Wirkung zahlreicher anderer Wachstumsfaktoren, Zytokine und intrazellulärer Botenstoffe in seiner Aktivität beeinflusst (Hennig et al. 2015). Dabei nimmt KRAS über die Kontrolle von Zellzyklus-Genen auch Einfluss auf die Zellproliferation. Störungen des Zellzyklus können eine Ursache für genetische Instabilität darstellen, welche als eine Voraussetzung für die Tumorentstehung gilt (Langie et al. 2015). KRAS-Mutationen entstehen schon in frühen Stadien der

Tumorentwicklung und konnten bereits in 58% der Adenome größer als 1 cm nachgewiesen werden (Vogelstein et al. 1988).

Die KRAS-Mutation ist derzeit hinsichtlich ihrer Rolle in der Tumorentwicklung oder ihrem Einfluss auf die Prognose Gegenstand der Kontroverse. So folgte eine Metaanalyse, dass der KRAS-Status nicht mit der Prognose korreliert (Ren et al. 2012). Im Rahmen der älteren RASCAL-II-Studie (Andreyev et al. 2001) kamen die Autoren jedoch zu dem Schluss, dass KRAS sehr wohl einen Einfluss auf Progress und Prognose beim KRK hat, wobei dieser Effekt bei bestimmten KRAS-Mutationen (z.B. Gly-Val auf Codon 12) besonders stark zu sein scheint (Russo et al. 2005).

KRAS ist darüber hinaus bisher der einzige molekulare Marker mit klinischer Relevanz, da über ihn eine direkte prädiktive Aussage zum Ansprechen auf eine EGFR-Antikörpertherapie getroffen werden kann (Custodio und Feliu 2013). Das Aufkommen einer gezielten EGFR-Antikörpertherapie mittels Cetuximab und Panitumumab hat die Therapieoptionen beim metastasieren KRK entschieden erweitert. Trotzdem sind die Mechanismen, warum einige Patienten gut auf eine Chemotherapie ansprechen und andere nicht, bisher zum großen Teil unverstanden. Die KRAS-Mutation ist insgesamt nur in ca. 30–40% der Fälle für das Versagen einer Antikörpertherapie verantwortlich. Dabei resultiert besonders das Vorliegen einer BRAF-Mutation in fehlendem Ansprechen auf die Antikörpertherapie (Di Nicolantonio et al. 2008). Auch Mutationen im EGFR-Rezeptor können eine Therapieresistenz bewirken, indem sie das Binden von Cetuximab behindern (Montagut et al. 2012). Interessanterweise zeigen Patienten mit normaler Expression von MET und PTEN trotz mutiertem KRAS ein gleichwertiges Ansprechen auf die Antikörpertherapie wie Patienten ohne KRAS-Mutation (Kishiki et al. 2014). Die Beobachtung, dass Mutationen im KRAS-Gen das Ansprechen auf Antikörpertherapie vermindern, hat vielen Tumorkranken unnötige Nebenwirkungen dieser Behandlung erspart und überflüssige Behandlungskosten verhindert. Trotzdem sollte infolge neuer Erkenntnisse über die Interaktion weiterer molekularer Marker die Restriktion der Therapie auf KRAS-Wildtyp-Patienten allein neu überdacht werden (Kishiki et al. 2014).

2.3 Aneuploidie

Aneuploidie bezeichnet eine abnorme Chromosomenanzahl, welche vom Vielfachen der normalen Chromosomenzahl abweicht, und stellt eine häufig auftretende Anomalie

vieler Neoplasien dar. So zeigen ca. 90% aller soliden Tumoren und über 50% der hämatopoetischen Neoplasien aberrante Chromosomenzahlen (Mitelman Database 2015). Der Begriff der Aneuploidie beinhaltet neben den numerischen auch strukturelle Veränderungen auf chromosomaler und sub-chromosomaler Ebene (Rajagopalan und Lengauer 2004). Es gibt Hinweise darauf, dass Aneuploidie entweder aus ungleicher Verteilung von Chromosomen während der Zellteilung oder aus progressivem Verlust von Chromosomen tetraploider Vorläufer resultiert (Davaadelger et al. 2014). Tetraploide Zellen zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber Strahlung und Chemotherapeutika im Vergleich zu diploiden Zellen, was auf eine veränderte Apoptoseregulierung durch TP53 in diesen Zellen hinweist (Castedo et al. 2006). Es wird angenommen, dass Aneuploidie sowohl beitragende Ursache als auch Folge der Karzinogenese ist. Konstitutionelle Aneuploidie ist einerseits eher mit verminderter Zellproliferation assoziiert, wobei durch Aneuploidie hervorgerufene spezifische Alterationen die Tumorentstehung durch ungehemmte Zellproliferation andererseits begünstigen können (Langie et al. 2015). Darüber hinaus gilt Aneuploidie als Marker für DNA-Schädigung und genomische Instabilität, welche durch hohe Raten an chromosomalem Gewinn und Verlust während der Zellteilung charakterisiert ist und deren Ausmaß mit einer schlechten Prognose für Tumoren im Allgemeinen vergesellschaftet ist (Schulze und Petersen 2011). In Bezug auf das kolorektale Karzinom konnte eine Metaanalyse eine Assoziation von aneuploiden Tumoren mit einem fortgeschrittenem Stadium sowie einer höheren Mortalität zeigen (Araujo et al. 2007). Ein gestörtes Gleichgewicht von Proteinen, die für DNA-Replikation und DNA-Reparatur sowie für die Mitose zuständig sind, führt als Folge von Aneuploidie zu vermehrten Chromosomenbrüchen und genomischer Instabilität (Langie et al. 2015). Des Weiteren wird der Energiehaushalt der Zelle gestört und die Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Einflüssen sogar erhöht, was *in vitro* zu langsamerer Zellvermehrung führt und als „Aneuploidie-Paradox“ bezeichnet wird. Tumorzellen *in vivo* könnten diese reduzierte Vermehrungsrate tolerieren, solange sie sich dadurch schneller weiterentwickeln und sich besser an die stets wandelnden intra- und extrazellulären Gegebenheiten anpassen können (Holland und Cleveland 2012). Interessanterweise zeigen kolorektale Karzinome mit langsamer Proliferationsrate sogar eine verstärkte Aggressivität und Fähigkeit zur Metastasierung (Anjomshoaa et al. 2009).

3. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit setzte sich zum Ziel, einen Beitrag zur Erforschung des Einflusses von KRAS und des Ploidie-Status auf das Tumorverhalten beim kolorektalen Karzinom zu leisten. Die Untersuchung unterschiedlicher molekularer Marker, ihrer Interaktion und ihrer Auswirkungen auf die Tumorprognose ist besonders aufgrund der personalisierten Tumorthherapie von Bedeutung.

Im Rahmen unserer Studie wurden insgesamt 52 Tumorproben von Patienten aus dem St. Georg Klinikum Eisenach und dem Universitätsklinikum Jena untersucht. Eine Zustimmung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Jena liegt dazu vor (Bearbeitungsnummer 4385-03/15 vom 15.06.2015).

Der KRAS-Mutationsstatus wurde mittels Sanger-Sequenzierung und der Grad der Ploidie durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der Chromosomenzentromere bestimmt.

Dabei wurde im Besonderen auf numerische Veränderungen der Chromosomen 4, 10 und 12 sowie auf Abweichungen der Kopienanzahl des KRAS-Gens geachtet. Diese Daten wurden als Surrogatmarker für den Ploidiestatus der Zellen verwendet.

Um die Auswirkungen von KRAS-Mutationsstatus und Ploidie auf die Ausprägung der Tumorerkrankung zu evaluieren, wurden diese Parameter mit den klinischen und pathohistologischen Daten wie Metastasierungsverhalten, Gesamtüberleben, Vorliegen eines Rezidivs und Tumorstadium korreliert.

Außerdem wurde der Einfluss einer erhöhten Anzahl von KRAS-Genkopien auf das Auftreten von Rezidiven hin analysiert.

Mit Hilfe der Auswertung der Gensequenzprofile des KRAS-Gens sollte zudem geprüft werden, ob aus dem Verhältnis der mutierten und nicht-mutierten KRAS-Allele eine Beziehung zum Ploidiestatus und der Kopienanzahl des KRAS-Gens hergestellt werden. Es wurde im Besonderen auf triploide Tumoren geachtet.

4. Publierte Originalarbeit

Pathology – Research and Practice 211 (2015) 646–651



Contents lists available at ScienceDirect

Pathology – Research and Practice

journal homepage: www.elsevier.com/locate/prp



Original Article

KRAS and aneusomy of chromosomes 4, 10 and 12 in colorectal carcinomas



Kristin Beyer^a, Annelore Altendorf-Hofmann^b, Yuan Chen^a, Klaus Bickel^c, Iver Petersen^{a,*}

^a Institute of Pathology, Jena University Hospital, Friedrich-Schiller-University, Ziegelmühlenweg 1, 07743 Jena, Germany

^b Department of General and Visceral and Vascular Surgery, Jena University Hospital, Friedrich-Schiller-University, Erlanger Allee 101, 07747 Jena, Germany

^c Department of General and Visceral Surgery, St. Georg Klinikum, Mühlhäuser Straße 94-95, 99817 Eisenach, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 March 2015

Received in revised form 10 May 2015

Accepted 20 May 2015

Keywords:

Colon cancer

RAS

Ploidy

Aneusomy

Chromosomal instability

ABSTRACT

Aims: KRAS mutation status has predictive significance in EGFR-antibody treatment of colorectal adenocarcinoma. The aim of the study was the evaluation of KRAS mutation status in correlation to KRAS copy numbers and ploidy status.

Methods: Colorectal adenocarcinomas ($n = 52$) were assembled into a TMA and analyzed by FISH. Probes for centromeres 4 and 10 were applied as surrogate markers for the ploidy status. In addition, a dual color FISH probe set for the centromere of chromosome 12 and the KRAS gene was applied to the TMA to analyze numerical alterations and KRAS gene copy numbers. Further we analyzed DNA sequence profiles of KRAS codons 12 and 13 to assess the allele status of the mutation within the tumor samples.

Results: KRAS mutation was confirmed in 24 cases, while 28 cases showed a wild-type KRAS status. The majority of cases showed diploid FISH signals for chromosomes 4 and 10. Near triploid FISH signals were observed in only 2 cases, 12 cases were hypodiploid, and 8 cases were hyperdiploid. In 6 cases, trisomy 12 could be ascertained. In total, aneuploidy could be detected in 28 cases, including cases with trisomy 12 and hypodiploidy 10. Tumors with aneuploid chromosomal content had a worse prognosis compared to euploid tumors, however, without reaching statistical significance ($p = 0.231$). Hypodiploid carcinomas carried the worst prognosis. Specifically, monosomy 10 was significantly associated with reduced survival ($p = 0.039$). Increased FISH signals of KRAS did not correlate significantly with relapse ($p = 0.916$).

Conclusions: FISH analysis can be used as a surrogate marker for the ploidy status. Loss of chromosome 10 may serve as a potential adverse prognostic marker being indicative for tumor progression.

© 2015 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

The development of colorectal carcinoma (CRC) is a multistep process known as adenoma-carcinoma sequence. It is initiated by benign adenoma, leading to malignant invasive and finally metastatic cancer. Cancer progression is characterized by an accumulation of mutations of proto-oncogenes and tumor suppressor genes, as well as the emergence of chromosomal instability [6].

Aneuploidy is commonly understood as an abnormal number of chromosomes in a cell, but the term may also describe structural aberrations of chromosomes that lead to gain or loss of genetic material being detectable by DNA content analysis [20]. Aneuploidy is a synonym for genomic imbalances being distinct from normal

or polyploid chromosome numbers. In general, the extent of aneuploidy is associated with a poor prognosis in carcinomas [17]. With regard to colorectal cancer, a meta-analysis suggested that aneuploid tumors are associated with a more advanced pathologic stage and a higher risk of death [3].

KRAS is a small GTPase, playing a major role in the EGFR-MEK-MAP kinase pathway. The KRAS gene belongs to the family of RAS oncogenes and is located on the short arm of chromosome 12 (12p.12.1). Gain of function mutations impair the intrinsic GTPase activity of KRAS and lead to constitutive, receptor-independent activation of downstream signaling.

As a crucial part of the EGFR-signaling pathway, RAS is not only involved in transmitting growth signals but also in the regulation of the cell cycle by controlling cyclin-levels via the MAP kinase pathway [2]. Defects in cell-cycle checkpoint components contribute to genetic instability [26].

KRAS mutations are detectable relatively early in colon carcinogenesis [16] and are found in about 58% of adenomas larger than

* Corresponding author. Tel.: +49 3641 933120; fax: +49 3641 933111.
E-mail address: iver.petersen@med.uni-jena.de (I. Petersen).

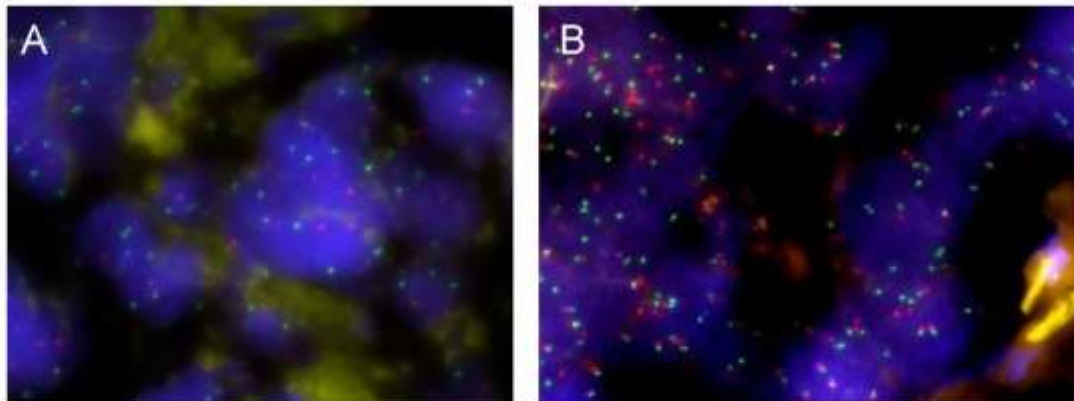


Fig. 1. Representative examples of the FISH-analysis. (A) KRAS wild-type triploid colon carcinoma showing three CEN4 (green) and CEN10 (orange) signals; (B) KRAS mutated colon carcinoma with polyploidy of chromosome 12 showing increased KRAS signals (green) and CEN12 signals (orange). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

1 cm [22]. In addition, they may be present in lesions that have only minimal potential to develop into a malignant tumor, i.e. hyperplastic polyps or aberrant crypt foci [7]. However, KRAS mutations are also relevant in tumor progression and seem to be associated with distant metastases [14].

A meta-analysis concluded that KRAS mutation status does not correlate with prognosis [16]. Nevertheless, subgroup analyses could show a significant reduction of the overall survival in patients with mutated KRAS codon 12. So far, the role of KRAS mutation status in tumor progression and survival time is inconclusive.

Multiple molecular markers in colorectal adenocarcinomas have been identified, but so far only KRAS mutation status has predictive significance being related to the treatment with EGFR-antibodies [6]. The possibility of this treatment modality seems to have a favorable prognostic impact in patients with left-sided primary tumors [23].

The main objective of our study was to gain a better understanding for the pathology of colorectal cancer regarding the impact of chromosomal changes. We therefore aimed to analyze the correlation between KRAS mutation status, KRAS copy number and ploidy. In order to assess the importance of chromosomal changes in tumor characteristics and progression, we correlated the KRAS status and ploidy with clinical parameters, such as tumor staging, grading and overall survival time.

2. Materials and methods

2.1. Patient eligibility

Formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples were derived from 52 patients who mostly underwent surgical tumor resection at the clinics for visceral surgery of the Jena University Hospital and the St. Georg Klinikum Eisenach between 2004 and 2010.

The patients were between 40 and 89 years of age and had histologically proven colorectal adenocarcinomas. The mean age was 68. Among them, 38% of the patients were female. The KRAS mutation status was determined by polymerase chain reaction (PCR) following Sanger DNA sequencing. The patient collective was selected to create almost equal sample sizes for mutant and wild-type KRAS status.

2.2. Methods

Genomic DNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor samples by using a QIAamp DNA FFPE

tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Before DNA isolation, suitable areas in hematoxylin and eosin (H&E) sections were marked by a pathologist. Manual microdissection was performed to minimize the contamination from normal tissues.

Genomic DNA isolated from the patient samples was subjected to mutation analysis. The sequences containing the hotspot mutations including exon 2 (codons 12 and 13) of KRAS were amplified by PCR using gene-specific primers (sense: 5'-GTGTGACATGTTCT-AATATAG-3'; anti-sense: 5'-TTGTTGGATCATATTTCGTCC-3').

PCR conditions were 95 °C for 15 min, 38 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 45 s and 72 °C for 30 s with a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR products were purified using a PCR purification kit (ZYMO Research, Germany), and 100 ng of purified PCR products were bidirectionally sequenced based on capillary electrophoresis (LGC Genomics, Germany).

The paraffin embedded tumor samples were then assembled into a tissue microarray (TMA) [5] and analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). We conducted an enzymatic digestion for six minutes in order to minimize connective tissue-related background artifacts.

A KRAS/Centromere (CEN) 12 dual color FISH probe (ZytoLight SPEC KRAS/CEN 12 dual color probe, ZytoVision, Bremerhaven, Germany) was used to detect numerical alterations of chromosome 12 as well as the copy number status of the KRAS gene. In addition, a CEN4 and CEN10 dual color FISH probe set (ZytoLight CEN 4/10 dual color probe, ZytoVision, Bremerhaven, Germany) was applied as a surrogate marker for the ploidy status (Fig. 1). We assumed aneuploidy when the mean number of CEN4 and CEN10 signals per cell fell below 1.8 or exceeded 2.2 (hypodiploid: ≤ 1.8 ; diploid: >1.8 and ≤ 2.2 ; hyperdiploid: >2.2 and ≤ 2.5 ; triploid: >2.5).

We counted 20–30 cell nuclei of every tumor sample to establish mean values of the centromere probes and the KRAS gene.

Further we analyzed DNA sequence profiles of KRAS codons 12 and 13 to assess the allele status of the mutation (heterozygous or homozygous, relative quantitation of both alleles by comparison of the profiles of each nucleotide) within the tumor sample (Fig. 2).

2.3. Statistical analysis

The clinical information was derived retrospectively from the patients' medical records. All but three patients were observed for at least 4 years after primary tumor resection or until death.

We used the log-rank test to analyze differences in overall survival. Associations between KRAS mutation status and tumor

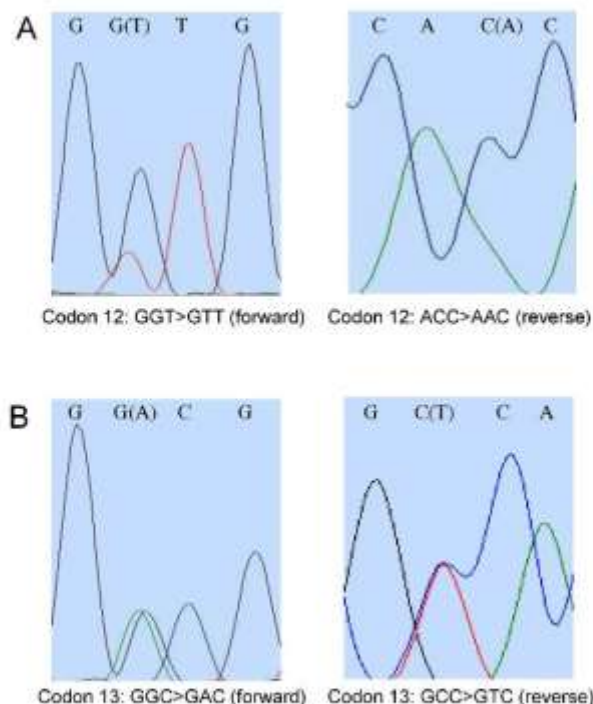


Fig. 2. Representative examples of KRAS sequencing analysis. (A) KRAS mutation in exon 12, relation of wild-type to mutated allele peak about 1:3; (B) KRAS mutation in exon 13 with almost equal relation (1:1) of the peak heights of both alleles.

characteristics were examined using Fisher's exact test. Statistical analysis was performed by using IBM SPSS Statistics.

3. Results

Clinical and pathological data of our study collective are summarized in Table 1.

KRAS mutation status has been determined in 52 cases. Among them, 24 cases exhibited mutations, while other 28 cases showed a wild-type KRAS status. The mutation sites were almost equally distributed among codons 12 and 13 in exon 2, two hot spots of KRAS mutation.

The majority of cases showed diploid FISH signals for chromosomes 4 and 10. Near triploid FISH signals were observed in only 2 cases, 12 cases were hypodiploid, and 8 cases were hyperdiploid. In 6 cases, trisomy 12 could be ascertained. In total, aneuploidy could be detected in 28 cases, including cases with trisomy 12 and hypodiploidy 10.

Table 1
Clinicopathological data on the 52 studied patients with colorectal adenocarcinoma.

Parameter	Category	n
Sex	Male	32
	Female	20
Age	Median	68
	Range	40–89
Site	Colon	36
	Rectum	16
R Classification	R0	37
	R1/R2	15
Stage	I/II	22
	III/IV	30
Grading	G1/G2	38
	G3	14

Complete resection status (Fig. 3A), M0-category and low grade (grade 1 or grade 2) (Fig. 3B) were predictive factors for survival ($p = 0.001$, $p = 0.002$, $p = 0.042$, respectively). However, KRAS mutation status was not significantly correlated with the ploidy status or overall survival (Fig. 3C). In addition, there was no significant correlation between the allele ratios of KRAS mutant samples and chromosome 12 or KRAS copy number or the ploidy status of the tumor samples. There was a tendency that tumors with aneuploid chromosomal content carried a worse prognosis (14 deaths of 20 cases in five years) compared to euploid tumors (17 deaths of 31 cases in five years). However, this result did not reach statistical significance ($p = 0.231$). This is most likely due to the small sample size. Subgroup analysis of tumors with KRAS mutation and aneuploid chromosomal content in comparison to KRAS wild-type euploid tumors did not reveal a negative effect on overall survival ($p = 0.801$).

Hypodiploid tumors carried the worst prognosis (Fig. 3E). Specifically, loss of chromosome 10 was statistically significantly associated with reduced survival ($p = 0.039$) compared to tumors with disomy 10. Median survival times were 11 and 40 months, respectively (Fig. 3F). Likewise, the loss of chromosome 12 seemed to be associated with worse outcome. However, this tendency was not statistically significant ($p = 0.628$). There was only a low frequency of hypodiploidy 12 in our collective ($n = 4$). Analysis of chromosome 4 showed no correlation with survival.

Increase of KRAS signals in the FISH positively correlated with relapse in R0-resected cases, yet not in a statistically significant way (Fig. 3D). We could not find any association between KRAS mutation and a higher prevalence of distant metastases.

4. Discussion

The development of sporadic colorectal cancer can be classified according to the underlying molecular changes into two main pathways: chromosomal instability (CIN) and microsatellite instability (MIN). The latter is caused by aberrant DNA mismatch repair. The CIN pathway, accounting for 80–85% of all sporadic CRCs, is typically characterized by aneuploidy and gross chromosomal aberrations that lead to unbalanced loss or gain of chromosomal material [11]. According to data derived from analyzing CRC cell lines, KRAS mutation appears in both pathways [1].

Our tumor collective was not molecularly analyzed for deficiencies in DNA mismatch repair enzymes. Epidemiology and the investigation of the clinical files did not suggest an association with Lynch syndrome/microsatellite instability. Only 4 patients were younger than 50 years. All of them had KRAS-negative tumors. One of these patients was clinically recorded to have suffered from the adenomatous polyposis coli syndrome. Additional 6 patients were younger than 60 years, none of the ten patients was reported to harbor a secondary malignant tumor. Ten patients developed adenocarcinomas of the right colon (cecum, colon ascendens, right flexure) of which 50% carried a KRAS mutation. Only one of these 10 patients, a 75-year-old man, suffered from a secondary bladder cancer. In total, secondary tumors could be documented from the clinical files in 10 patients and consisted of carcinomas of the bladder ($n = 2$), breast ($n = 2$), kidney, prostate, penis, endometrium, stomach, lung and ovary. KRAS mutations in the colon carcinomas of these patients were evident in 6 cases.

KRAS mutations were associated with distant metastases in the literature [14]. In our study though, KRAS mutation did not reveal significant effects on overall survival or any association with distant metastasis. However, aberrant KRAS copy numbers might be associated with relapse, yet not statistically significant. So far, the role of KRAS regarding tumor progression and survival is still a matter of debate.

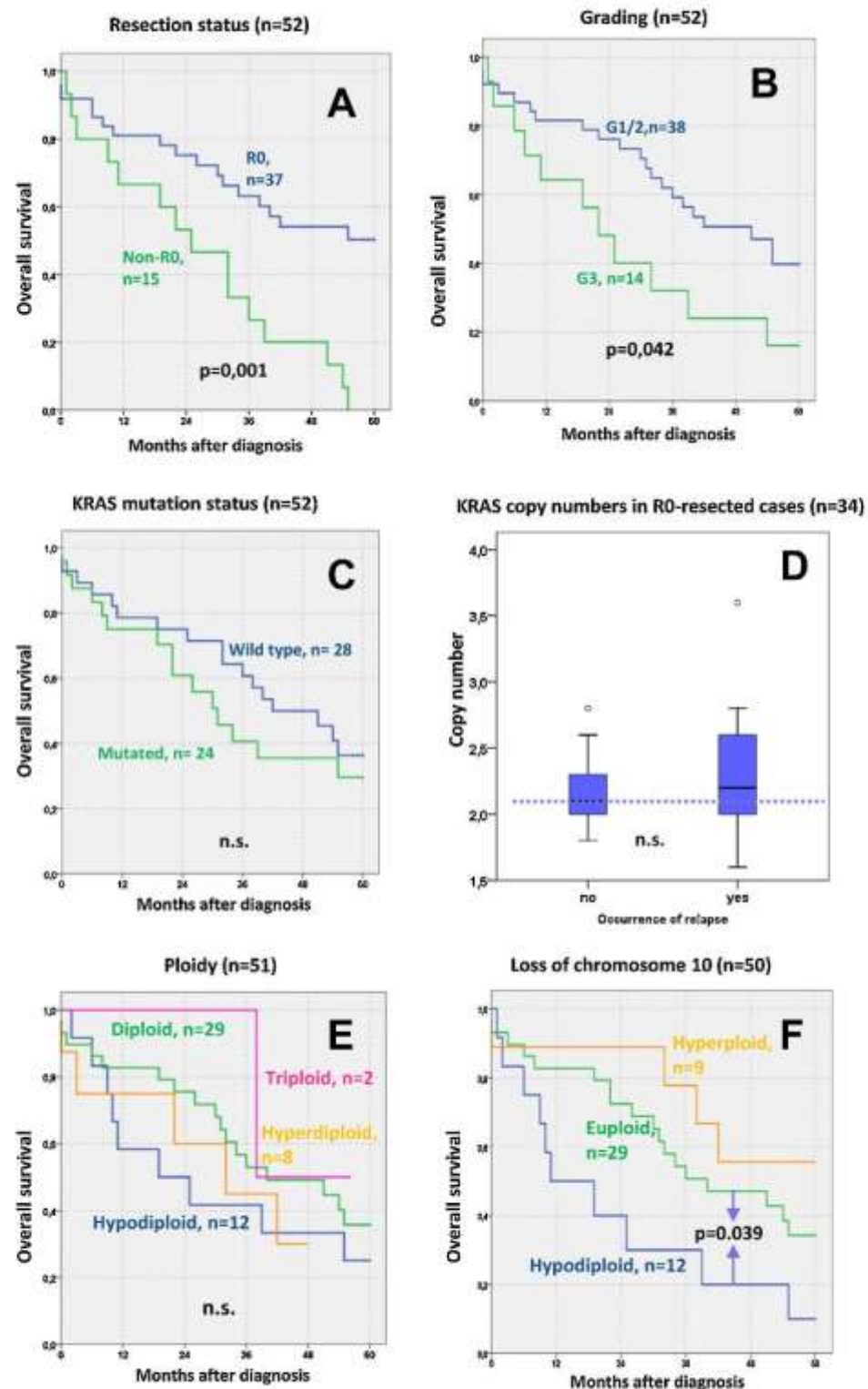


Fig. 3. Statistical analysis of the study collective. Kaplan-Meier survival analysis revealed significance for survival regarding the histopathological parameters resection status (A) and tumor grading (B). In contrast, KRAS mutation status (C), KRAS copy number (D), and ploidy determined by FISH (E) were not associated with statistical significant differences. However, monosomy 10 may represent a relevant marker for patient survival (F).

It has to be noted that our sample collective consists of relatively young patients with advanced colorectal adenocarcinomas with or without KRAS mutations. As KRAS mutation status is generally determined with therapeutic intent in clinical practice, patients preferably carry tumors with incomplete resection and advanced TNM status. Differences in these two parameters led to considerable heterogeneity of clinical conditions, presumably masking possible effects of KRAS mutation status and ploidy on survival. Fifteen out of the 52 tumors were not completely resectable due to distant metastases in 12 cases or peritoneal carcinomatosis.

Originally, we hypothesized that KRAS sequence profiles may indicate the ploidy status. We were especially interested in the presence of triploidy as it seemed to be associated with poor prognosis in a correlative study linking chromosome numbers to reported survival times of different entities, including colorectal cancer [17]. In gene sequence profiles, point mutations are marked by double peaks. The height of the peaks suggests the ratio of mutated-KRAS/wild-type-KRAS within the tumor sample. Homozygosity of KRAS mutation is a rather rare event, and so far we have not yet found it in patients' samples with colorectal adenocarcinoma. But it has nevertheless been determined in four of 24 cell lines of colon cancer in one study [18] and even in 38% of cell lines derived from lung, pancreatic and colon cancer in another survey [20]. Assuming heterozygosity, triploid tumors may theoretically carry two wild-type versus one mutant allele or two mutated alleles versus one wild-type allele of KRAS, forming two clearly discriminable peaks. Diploid tumors, on the other hand, might show two nearly similar peaks. Only one of the two triploid cases of our collective carried a KRAS mutation but presented similar peaks in the sequence analysis. Moreover, diploid tumors or those with 2 KRAS and/or chromosome 12 copies frequently showed unequal peaks in the sequence profile, arguing against our hypothesis that the Sanger sequencing profiles might correlate with KRAS copy number or ploidy status of KRAS mutant tumors.

Still, it is in our view noteworthy that the KRAS mutant allele is usually not the dominant one in the sequence profile, suggesting that potentially not all tumor cells carry the mutant allele. This observation is even more pronounced for other gene mutations, specifically GNAS1 [24,25]. It is yet unclear whether there is any biological relevance behind this observation. Regarding RAS, it may be linked to the fact that the mutation might result in oncogene-induced senescence [10]. Thus, overactivation of RAS by a homozygous mutation in the majority of tumor cells may not be compatible with tumor cell survival. The cell lines with homozygous mutations might have evolved other escape mechanisms to bypass this deleterious activation of the pathway. Tumor cell lines may be divided into more or less oncogene-addicted groups, KRAS mutations do not necessarily have to exert an equal influence on all tumor cells. Thus, KRAS-independent cell lines might be represented by lowered levels of KRAS protein, while elevated KRAS protein expression is correlated with KRAS-dependency. The underlying mechanism might be epigenetic silencing or activation of other tumor suppressors and oncogenes [19].

According to a meta-analysis, aneuploid colorectal carcinomas carried a worse prognosis [3]. We observed only a significant correlation between chromosome 10 monosomy and reduced survival but not aneuploidy as determined by FISH. Loss of chromosome 10 may serve as a potential marker for tumor progression or decreased survival. It seems reasonable to assume that the loss of tumor suppressor genes located on chromosome 10 may be causatively involved in tumor progression and cancer-related death. One possible candidate might be PTEN which is located on 10q23.3 and represents the downstream inhibitor of the PI3K/Akt pathway. PTEN protein expression was associated with longer time to progression in a subgroup analysis of KRAS and BRAF wild-type

patients [15]. In our study, metastasis was more common in the subgroup of tumors with loss of chromosome 10 (58%) compared to cases with normal or elevated content of chromosome 10 (28% and 33%, respectively). A study stated that loss of PTEN expression was associated with a higher rate of distant metastases in a statistically significant way [13]. We previously reported that deletions of chromosome 10 were seen in hematogenous and liver metastases of colorectal cancer [9]. The study was based on the analysis of alterations during lymphatic and liver metastasis in comparison to the corresponding primary tumors. Loss of chromosome 10 does affect PTEN gene copy numbers and thus has potential influence on the expression level of the gene. In addition, the PTEN gene has been reported to be silenced by methylation and point mutations [12]. Another candidate might be the PDCD4 gene on chromosome 10q24. Its downregulation in lung cancer was associated with tumor progression and poor prognosis [4].

The ploidy status of tumors is usually determined by DNA measurement using either flow cytometry or static DNA image analysis [8,21,27]. FISH represents an interesting alternative method because it is widely used in the diagnostic setup of many pathological institutes. Furthermore, quantification of FISH signals has become a routine in predictive molecular pathology like HER2 analysis. In general, the frequency of aneuploid and near triploid cases of our FISH study is comparable with published DNA cytometry data [8,21,27]. In particular, our recent DNA ploidy analysis confirmed the presence of hypodiploid colon tumors and pointed to a putative relevance of hypodiploidy in the transition from adenomas to carcinomas [21]. We therefore feel that ploidy analysis by FISH together with the assessment of specific chromosomes with prognostic relevance may become a useful ancillary tool in tumor pathology.

5. Conflict of interest

All authors declare no conflict of competing interests.

Acknowledgments

We thank Angela Gröbner, Christiane Geier, Cornelius Wölfel and other colleagues from the institute of pathology for technical assistance. Further, we are indebted to Piere Rogalla and Sven Hauke from ZytoVision GmbH for providing the KRAS/CEN12 and CEN4/CEN10 dual color FISH probes. Last but not least we thank Hans-Joachim Schulz and Thomas Meier for providing tumor samples.

References

- [1] D. Ahmed, P.W. Eide, I.A. Elertsen, S.A. Danielsen, M. Elnaes, M. Hektoen, G.E. Lind, R.A. Lothe, Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines, *Oncogenesis* 2 (2013) e71, PMID: 24042735.
- [2] C. Ambrosino, A.R. Nebreda, Cell cycle regulation by p38 MAP kinases, *Biol. Cell* 93 (2001) 47–51, PMID: 11730321.
- [3] S.E. Araujo, W.M. Bernardo, A. Haber-Gama, D.R. Kiss, I. Cecconello, DNA ploidy status and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis of published data, *Dis. Colon Rectum* 50 (2007) 1800–1810, PMID: 17874166.
- [4] Y. Chen, T. Knosel, G. Kristiansen, A. Pletas, M.E. Garber, S. Matsushita, I. Ozaki, I. Petersen, Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis, *J. Pathol.* 200 (2003) 640–646, PMID: 12858601.
- [5] Y. Chen, M. Pacyna-Gengelbach, F. Ye, T. Knosel, P. Lund, N. Deutschmann, K. Schlum, W.F. Koth, C. Sers, H. Yasumoto, T. Ustui, I. Petersen, Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) has potential tumour-suppressive activity in human lung cancer, *J. Pathol.* 211 (2007) 431–438, PMID: 17236181.
- [6] V. Deschoolmeester, M. Baay, P. Specenier, F. Lardon, J.B. Vermorken, A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy, *Oncologist* 15 (2010) 699–731, PMID: 20584808.
- [7] E.R. Fearon, Molecular genetics of colorectal cancer, *Annu. Rev. Pathol.* 6 (2011) 479–507, PMID: 21090960.

- [8] W. Giarretti, M. Danova, E. Geido, G. Mazzini, S. Sciallero, H. Aste, Flow cytometric DNA index in the prognosis of colorectal cancer, *Cancer* 67 (1991) 1921–1927, PMID: 2004305.
- [9] T. Knösel, K. Schlöns, U. Stein, H. Schwabe, P.M. Schlag, M. Dietel, I. Petersen, Chromosomal alterations during lymphatic and liver metastasis formation of colorectal cancer, *Neoplasia* 6 (2004) 23–28, PMID: 15068668.
- [10] L.G. Larsson, Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence, *Semin. Cancer Biol.* 21 (2011) 367–376, PMID: 22037160.
- [11] L. Migliore, F. Migliori, R. Spisni, F. Coppede, Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer, *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 792362, PMID: 21490705.
- [12] F. Molinari, M. Frattini, Functions and regulation of the PTEN gene in colorectal cancer, *Front. Oncol.* 3 (2013) 326, PMID: 24475377.
- [13] J. Neumann, L. Wehweck, S. Maatz, J. Engel, T. Kirchner, A. Jung, Alterations in the EGFR pathway coincide in colorectal cancer and impact on prognosis, *Virchows Arch.* 463 (2013) 509–523, PMID: 23934607.
- [14] U. Nitsche, R. Rosenberg, A. Balmert, T. Schuster, J. Stotta-Huspenina, P. Herrmann, F.G. Bader, H. Friess, P.M. Schlag, U. Stein, K.P. Janssen, Integrative marker analysis allows risk assessment for metastasis in stage II colon cancer, *Ann. Surg.* 256 (2012) 763–771, Discussion 771, PMID: 23095620.
- [15] E. Razin, G. Pentheroudakis, G. Rigakos, M. Bobos, G. Kouvatseas, O. Tzaida, T. Makatsoris, P. Papakostas, M. Bai, A. Gounia, E. Samantas, D. Papamichael, O. Romanidou, I. Efstratiou, E. Tsolaki, A. Psyrri, W. De Roock, D. Bafaloukos, G. Klouvas, S. Tejpar, K.T. Kalogeris, D. Pectasides, G. Fountzilas, EGFR gene gain and PTEN protein expression are favorable prognostic factors in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with cetuximab, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 140 (2014) 737–748, PMID: 24595598.
- [16] J. Ren, C. Li, J. Ge, X. Li, Y. Zhao, Is K-ras gene mutation a prognostic factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis, *Dis. Colon Rectum* 55 (2012) 913–923, PMID: 22810479.
- [17] S. Schulze, I. Petersen, Gender and ploidy in cancer survival, *Cell. Oncol.* 34 (2011) 199–208, PMID: 21424817.
- [18] R. Seth, S. Crook, S. Ibrahim, W. Fadhill, D. Jackson, M. Ilyas, Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer, *Gut* 58 (2009) 1234–1241, PMID: 19474062.
- [19] A. Singh, P. Greninger, D. Rhodes, L. Koopman, S. Vinietto, N. Bardeesy, J. Settleman, A gene expression signature associated with “K-Ras addiction” reveals regulators of EMT and tumor cell survival, *Cancer Cell* 15 (2009) 489–500, PMID: 19477428.
- [20] J. Soh, N. Okumura, W.W. Lockwood, H. Yamamoto, H. Shigematsu, W. Zhang, R. Chari, D.S. Shames, X. Tang, C. MacAulay, M. Varella-Garcia, T. Voeder, L.L. Wistuba, S. Lam, R. Brekken, S. Toyooka, J.D. Minna, W.J. Lam, A.F. Gazdar, Oncogene mutations, copy number gains and mutant allele specific imbalance (MASI) frequently occur together in tumor cells, *PLoS ONE* 4 (2009) e7464, PMID: 19826477.
- [21] J. Staarmann, W.A. Koth, I. Petersen, DNA ploidy and morphology of colon tumors in the adenoma-carcinoma sequence, *Folia Histochem. Cytobiol.* (2015), PMID: 25677247.
- [22] B. Vogelstein, E.R. Fearon, S. Hamilton, E.K. Scott, A. Preisinger, M. Leppert, A. Smits, J. Bos, Genetic Alterations during colorectal-tumor development, *N. Engl. J. Med.* 319 (1988) 525–532, PMID: 2841597.
- [23] J.C. von Einem, V. Heinemann, L.F. von Weizsäcker, U. Vebbing-Kaiser, M. Stauch, H.G. Hass, T. Decker, S. Klein, S. Held, A. Jung, T. Kirchner, M. Haas, J. Holch, M. Michl, P. Aubele, S. Boeck, C. Schulz, C. Giessen, S. Stintzing, D.P. Modest, Left-sided primary tumors are associated with favorable prognosis in patients with KRAS codon 12/13 wild-type metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus chemotherapy: an analysis of the AIO KKK-0104 trial, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 140 (2014) 1607–1614, PMID: 24816724.
- [24] B.M. Walther, I. Walther, Y. Chen, I. Petersen, GNAS1 mutation analysis in gastrointestinal tumors, *Folia Histochem. Cytobiol.* 52 (2014) 90–95, PMID: 25007176.
- [25] I. Walther, B.M. Walther, Y. Chen, I. Petersen, Analysis of GNAS1 mutations in myxoid soft tissue and bone tumors, *Pathol. Res. Pract.* 210 (2014) 1–4, PMID: 24268734.
- [26] N. Walworth, Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle, *Curr. Opin. Cell Biol.* 12 (2000) 697–704, PMID: 11063934.
- [27] Y. Yamazoe, S. Maetani, T. Nishikawa, H. Onodera, T. Tobe, M. Imamura, The prognostic role of the DNA ploidy pattern in colorectal cancer analysis using paraffin-embedded tissue by an improved method, *Surg. Today* 24 (1994) 30–36, PMID: 8054772.

5. Diskussion

Molekulare Analysen haben gezeigt, dass die Entstehung kolorektaler Karzinome nicht einheitlich verläuft. Die Karzinogenese der sporadischen Tumoren wird daher anhand der zugrunde liegenden molekularen Veränderung in zwei Pfade eingeteilt: chromosomale Instabilität (CIN) und Mikrosatelliteninstabilität (MIN oder MSI). Mikrosatelliten sind kurze, repetitive Sequenzen der DNA, die besonders anfällig sind für fehlerhafte Basenpaarung sowie kleine Insertionen oder Deletionen bei der Replikation. Eine Mikrosatelliteninstabilität liegt ca. 15% der kolorektalen Tumoren zugrunde. Sie ist in den meisten Fällen verursacht durch Mutationen oder epigenetische Modifikationen sogenannter DNA-Mismatch-Reparaturgene (Migliore et al. 2011). Es handelt sich dabei um die Gene MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2. Diese können somatisch, d.h. im Tumorgewebe, beispielsweise durch eine Hypermethylierung des Genpromoters (z.B. MLH1) inaktiviert werden, was bei den meisten sporadischen kolorektalen Karzinomen mit MSI der Fall ist (Jass 2007). Daneben können sie durch Keimbahnmutationen inaktiviert werden, was mit einer erhöhten Neigung zur Tumorentstehung assoziiert ist. Hierbei handelt es sich um das sogenannte HNPCC- oder Lynch-Syndrom, welches für ca. 3-5% aller kolorektaler Karzinome verantwortlich sein soll (Neumann et al. 2015, Rustgi 2007). Interessanterweise behalten Tumorzellen mit einer Mikrosatelliteninstabilität trotz der hohen Mutationsrate einen diploiden oder nahezu diploiden Chromosomensatz bei (Lengauer et al. 1997). Die verbleibenden 85% der Tumoren entstehen infolge chromosomaler Instabilität, welche durch Aneuploidie, Verlust von Allelen, Genamplifikationen und Translokationen gekennzeichnet ist (Popat et al. 2005). Chromosomale Instabilität wird definiert als verstärkte Tendenz des Genoms, Mutationen anzuhäufen (Shen 2011). Einer Untersuchung von KRK-Zelllinien zufolge ereignen sich KRAS-Mutationen im Verlauf beider Pfade (Ahmed et al. 2013).

5.1 Einordnung des Patientenkollektivs nach klinisch-pathologischen und demographischen Kriterien

Das Patientenkollektiv bestand überwiegend aus verhältnismäßig jungen Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung (32 Männer und 20 Frauen). Das mediane Alter lag

bei 68 Jahren, die Spanne reichte von 40 bis 89 Jahren. Dreißig der 52 Patienten befanden sich im UICC-Stadium III oder IV ihrer Erkrankung.

Das Tumorkollektiv wurde nicht direkt auf Defekte in DNA-Reparaturmechanismen hin untersucht, welche unter anderem eine Mikrosatelliteninstabilität zur Folge haben können. Es ergaben sich anhand der klinischen Informationen keine Hinweise auf das Vorliegen einer MSI auf der Basis eines HNPCC-/ Lynch-Syndroms. Tumoren mit zugrunde liegender konstitutioneller MSI sind erfahrungsgemäß eher proximal im Colon ascendens lokalisiert, histologisch schlecht, muzinös oder siegelringzellig differenziert und zeigen häufig eine starke Lymphozyteninfiltration (Popat et al. 2005). Auch das Vorliegen medullärer Karzinome sollte an eine MSI denken lassen. Anhand der revidierten Bethesda-Kriterien sollte bei folgenden Merkmalen eine Untersuchung auf ein Lynch-Syndrom erfolgen:

1. Diagnose eines KRK vor dem 50. Lebensjahr
2. Diagnose von syn- oder metachronen KRK oder anderen HNPCC-assoziierten Tumoren (u.a. Endometrium, Magen, Ovar, Pankreas, Ureter, Keratoakanthome, Glioblastome) unabhängig vom Alter bei Diagnose
3. Diagnose eines KRK vor dem 60. Lebensjahr mit typischer Histologie eines MSI-Tumors
4. Diagnose eines KRK bei mindestens einem erstgradig Verwandten mit einem HNPCC-assoziierten Tumor, davon eine Tumordiagnose vor dem 50. Lebensjahr
5. Diagnose eines KRK bei zwei oder mehr erstgradig Verwandten mit einem HNPCC-assoziierten Tumor, unabhängig vom Alter

Nur vier der Patienten waren jünger als 50 Jahre. Diese hatten ohne Ausnahme KRAS-negative Tumoren. Sechs weitere Patienten waren jünger als 60 Jahre, hatten allerdings keine sekundären Tumoren. Bei einem Patienten war ein Familiäres Adenomatöses Polyposis-Syndrom bekannt. Eine rechtsseitige Tumorlokalisation in Caecum, Colon ascendens oder rechter Flexur lag bei zehn Patienten vor. Nur einer dieser zehn Patienten, ein 75 Jahre alter Mann, war an einem Zweitumor der Harnblase erkrankt. Insgesamt waren bei zehn Patienten des Kollektivs folgende Zweitumoren bekannt: Harnblasenkarzinome (n = 2), Mammakarzinome (n = 2), sowie Nieren-, Prostata-,

Penis-, Endometrium-, Magen-, Lungen- und Ovarialkarzinome. Bei sechs dieser Patienten konnte in den kolorektalen Tumorzellen eine KRAS-Mutation nachgewiesen werden.

5.1 KRAS und Überleben

KRAS-Wildtyp- und KRAS-mutierte Tumoren waren im Patientenkollektiv zu etwa gleichen Anteilen vertreten. So war bei 24 Tumoren KRAS mutiert, bei 28 Tumoren lag der Wildtyp vor. In der klinischen Praxis wird der KRAS-Status aus therapeutischen Überlegungen heraus erst bei unvollständiger Tumorresektion oder bei fortgeschrittenem TNM-Status bestimmt, wenn eine Chemotherapie mit EGFR-Antikörpern eine mögliche Behandlungsoption darstellt. Insgesamt waren 15 der 52 Tumoren nicht vollständig resektabel, entweder aufgrund von Fernmetastasen in 12 Fällen oder infolge einer Peritonealkarzinose. Die Unterschiede im Resektions- und TNM-Status führten zu einer beträchtlichen Heterogenität der klinischen Ausgangsbedingungen für eine vergleichende Studie. So erwiesen sich die vollständige (R0-) Resektion des Tumors ($p = 0,001$), das Vorliegen von low-grade Tumoren ($p = 0,042$) und das initiale Fehlen von Metastasen ($p = 0,002$) als beste Prädiktoren für das Überleben der Patienten. Vermutlich überlagerte diese Heterogenität möglicherweise vorhandene Einflüsse von KRAS-Mutation und Ploidie auf das Gesamtüberleben.

Das Vorliegen von KRAS-Mutationen wurde in einzelnen Studien mit dem Auftreten von Metastasen assoziiert (Nitsche et al. 2012). Wir konnten jedoch keine signifikanten Effekte von KRAS-Mutationen auf das Gesamtüberleben oder das Auftreten von Metastasen nachweisen, was vermutlich auf die geringe Fallzahl zurückzuführen ist. Auch war die KRAS-Mutation nicht mit einem bestimmten Ploidiestatus assoziiert. Allerdings schien eine vermehrte Anzahl an KRAS-Genkopien mit einer erhöhten

Wahrscheinlichkeit bei R0-resezierten Fällen einherzugehen. Dieser Effekt war jedoch nicht statistisch signifikant. Die Rolle von KRAS hinsichtlich Tumorprogress und Überleben bleibt weiter Gegenstand der Diskussion.

5.2 Auswertung der Sequenzprofile

In den Gensequenzprofilen nach der Sanger-Sequenzierung können die Basenpaare beider Allele des KRAS-Gens aufgeschlüsselt und die Punktmutationen in einem Allel

durch doppelte „Peaks“ im Sequenzprofil ersichtlich werden (siehe Abb.2 der Publikation). Dabei entspricht die Höhe der Peaks dem Verhältnis aus mutiertem vs. nicht-mutiertem KRAS in der Tumorprobe. Das Vorliegen einer homozygoten KRAS-Mutation, also der Mutation beider Allele, ist eher selten anzutreffen und konnte in unseren Tumorproben nicht nachgewiesen werden. In diesem Kontext sei darauf hingewiesen, dass die Überaktivierung eines Onkogens zu zellulärer Seneszenz (sogenannte oncogene-induced senescence, OSI) führen kann und dieser Prozess als ein Schutzmechanismus gegen die Entstehung maligner Tumoren angesehen wird (Collado und Serrano 2014). Gleichwohl konnten homozygote KRAS-Mutationen in vier von 24 KRK-Zelllinien nachgewiesen werden (Seth et al. 2009). In einer anderen Studie zeigten 38% der untersuchten Zelllinien von Lungen-, Pankreas- und Kolonkarzinom homozygote KRAS-Mutationen (Soh et al. 2009).

Entsprechend der ursprünglichen These sollten über die Sequenzprofile von KRAS Aussagen zur Ploidie des gesamten Zellkerns getroffen werden können. Besonders interessant war das Vorliegen einer Triploidie, da ein verdreifachter Chromosomensatz mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Das konnte neben anderen Entitäten auch für das KRK gezeigt werden (Schulze und Petersen 2011).

Unter der Annahme einer heterozygoten Mutation tragen triploide Tumoren theoretisch zwei Wildtyp-Allele und ein mutiertes Allel oder ein Wildtyp-Allel und zwei mutierte Allele. In der Gensequenzanalyse wird das durch zwei klar voneinander zu unterscheidende Peaks dargestellt. Diploide Tumoren hingegen zeigen theoretisch zwei nahezu gleiche Peaks, welche das mutierte und das nicht-mutierte Allel repräsentieren. Nur in einem der zwei triploiden Fälle konnte eine KRAS-Mutation nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich in der Gensequenzanalyse dieses triploiden Tumors nahezu identische Peaks. Darüber hinaus zeigten diploide Tumoren häufig unterschiedliche Peaks, obwohl das Vorliegen von zwei Genkopien ein ausgewogenes Verhältnis aus mutierten und nicht-mutierten Allelen nahegelegt hätte. Eine Beziehung zwischen den KRAS-Sequenzprofilen und der KRAS-Kopienanzahl in der FISH konnte ebenfalls nicht hergestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der Hypothese, dass sich aus den Gensequenzprofilen Rückschlüsse auf die KRAS-Kopienanzahl oder den Ploidiestatus KRAS-mutierter Tumore ziehen lassen. Eine Korrelation zwischen der Analyse der Gensequenzprofile und dem Verhältnis von

mutiertem zu nicht-mutiertem KRAS-Allelstatus ist gleichwohl möglich (Soh et al. 2009).

Die Untersuchung der Gensequenzprofile zeigte, dass das mutierte KRAS-Allel häufig nicht das anteilmäßig dominante Allel ist, sondern den kleineren Peak bildet. Daraus kann gefolgert werden, dass nicht alle Tumorzellen innerhalb eines Tumors die KRAS-Mutation aufweisen. Diese Tatsache konnte schon bei anderen Genmutationen wie beispielsweise dem GNAS1-Gen beobachtet werden (Walther et al. 2014a, Walther et al. 2014b). Die Bedeutung dieser Beobachtungen hinsichtlich der Tumorbilogie ist noch weitgehend unverstanden. Hinsichtlich der RAS-Mutation kann das Vorliegen einer Onkogen-induzierten Seneszenz einzelner Tumorzellen vermutet werden (Larsson 2011). Ein überaktives RAS, im Besonderen hervorgerufen durch eine homozygote Mutation, ist wahrscheinlich unvereinbar mit dem Überleben der meisten Tumorzellen. Möglicherweise haben die Zelllinien der zuvor erwähnten Studien von Soh et al. (2009) und Seth et al. (2009) besondere Rettungsmechanismen entwickelt, um der tumorsupprimierenden Auswirkung eines überaktiven RAS-Signalwegs zu entgehen.

Basierend auf dem Prinzip der „oncogene addiction“ (Weinstein 2002) können Tumore generell in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden, welche entweder mehr oder weniger stark von der Wirkung eines Onkogens abhängig sind. Deshalb muss die KRAS-Mutation nicht zwingend denselben Einfluss auf alle Tumorzellen gleichermaßen ausüben. Eine Abhängigkeit von der KRAS-Mutation kann sogar zu einer, im Vergleich zu Zellen mit KRAS-Wildtyp, erhöhten Empfindlichkeit gegenüber kombinierten Chemotherapeutika führen (Steckel et al. 2012). Dabei scheinen KRAS-mutierte Zellen aufgrund des mutationsinduzierten Dauerstresses weniger gut mit einer DNA-Schädigung umgehen zu können und zeigen eine erhöhte Induktion von p53, ROS und G2/M-Arrest. Von der KRAS-Mutation weitestgehend unabhängige Zelllinien sind durch ein normales Ausmaß an KRAS-Protein gekennzeichnet, während KRAS-abhängige Zelllinien bei Lungen- und Pankreastumoren auf eine verstärkte Transkription und Translation des KRAS-Gens, Gen-Amplifikation oder ein hyperaktives Genprodukt angewiesen sind (Singh et al. 2009). Hier scheint die Abhängigkeit von KRAS an die epitheliale Differenzierung der Zelle gebunden zu sein und sich infolge der epithelial-mesenchymalen Transformation zu verringern (Singh et al. 2009). Außerdem scheint auch eine Abhängigkeit gegenüber Prozessen zu bestehen, die nicht direkt von KRAS gesteuert werden, sondern die durch Stress der Zelle initiiert

werden, welcher durch den Transformationsprozess selbst ausgelöst wird. Dies wird auch als „non-oncogene addiction“ bezeichnet (Steckel et al. 2012). KRAS-unabhängige Tumorzellen profitieren hingegen von epigenetischer Aktivierung oder Ausschaltung anderer Tumorsuppressorgene und Onkogene (Singh et al. 2009).

5.3 Aneuploidie und Überleben

Laut einer Metaanalyse haben aneuploide kolorektale Karzinome eine schlechtere Prognose im Vergleich zu diploiden Tumoren (Araujo et al. 2007). In einer Mehrzahl der dabei untersuchten Studien wurde Aneuploidie mit einem fortgeschrittenen pathologischen Stadium und einer höheren Mortalität nach chirurgischer Intervention assoziiert. Im Gegensatz zu den meisten in der Metaanalyse betrachteten Studien haben wir die Ploidie nicht per Durchflusszytometrie oder statischer DNA-Analyse bestimmt, sondern die Kopienanzahl der Chromosomenzentromere 4, 10 und 12 durch FISH ermittelt und als Surrogatmarker einer Aneuploidie verwendet. Der Anteil aneuploider oder nahezu triploider Tumoren in der FISH-Analyse war im Allgemeinen vergleichbar mit Daten aus zytometrischen Analysen (Giaretti et al. 1991, Staarmann et al. 2015, Yamazoe et al. 1994). Die meisten Tumore zeigten einen diploiden Chromosomensatz (29 Fälle), Hypodiploidie konnte in zwölf Fällen nachgewiesen werden, Hyperdiploidie in acht Fällen und Triploidie in zwei Fällen.

In unserer Studie wies die Mehrheit der Patienten mit Metastasen gleichzeitig eine Aneuploidie auf (13 der 18 Fälle). Dies entspricht auch den Ergebnissen einer Studie, die Aneuploidie als prädiktiven Marker für metachrone Metastasen beim KRK beschrieb (Laubert et al. 2013). Jedoch konnten wir keine signifikant reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit für Träger aneuploider Tumoren per se feststellen, wenn auch ein Trend zu Ungunsten aneuploider Tumore zu erkennen war. Auch in der Gegenüberstellung von KRAS-mutierten und aneuploiden Tumoren mit KRAS-negativen und euploiden Tumoren zeigte sich kein signifikanter Überlebensvorteil für die zweite Gruppe. Besonders hypodiploide Tumoren zeigten einen Trend zu schlechterem Überleben im Vergleich zu diploiden oder hyperdiploiden Tumoren, wenn auch nicht signifikant. Veränderungen der Chromosomenzahl scheinen nicht nur Einfluss auf den Progress der bestehenden Tumorerkrankung zu nehmen, sondern auch den Übergang von prä-malignen zu malignen Zellen zu fördern. So wurden Veränderungen des DNA-Gehalts bereits in prä-malignen Geweben wie bei der Colitis ulcerosa (Schimmelpenning et al. 2000) oder in Kolonadenomen gefunden (Staarmann

et al. 2015). Auch das Vorkommen von hypodiploiden Zellen in adenomatösem Gewebe im Randbereich eines Kolonkarzinoms könnte auf eine bedeutende Rolle von Aneuploidie und besonders Hypodiploidie beim Übergang von benignen Adenomen zu Karzinomen hinweisen (Staarmann et al. 2015).

5.4 Verlust von Chromosom 10 als Marker für Tumorprogress und vermindertes Überleben

Die Träger einer Monosomie bzw. Hypodisomie 10 zeigten ein signifikant verkürztes Überleben ($p = 0,039$). Der Verlust des Chromosoms 10 könnte daher als potentieller Marker für Tumorprogress und vermindertes Überleben Berücksichtigung finden. Ursächlich dafür könnte der Verlust von Tumorsuppressorgenen sein, die auf Chromosom 10 lokalisiert sind. Ein Beispiel dafür ist der Tumorsuppressor PTEN, dessen Gen auf dem Chromosomenabschnitt 10q23.3 liegt und welcher den PI3K/Akt-Signalweg hemmt. Dieser Signalweg wird ebenfalls durch den EGFR-Rezeptor gesteuert und ist maßgeblich in Überleben, Proliferation und Motilität der Zelle involviert (Vivanco und Sawyers 2002). Eine verminderte Hemmung oder Überaktivierung dieses Signalwegs trägt möglicherweise zum Verlust von TP53, dem „Wächter des Genoms“, bei, wie eine Studie an KRK-Zelllinien zeigte (Ahmed et al. 2013). TP53 ist im Besonderen für die Integrität des Genoms verantwortlich und leitet bei irreparablen Schäden der Zelle die Apoptose ein. Weiterhin zeigte sich in einer Untergruppen-Analyse von KRAS- und BRAF-Wildtyp-Tumoren eine längere progressionsfreie Zeit wenn PTEN exprimiert wurde (Razis et al. 2014).

In unserer Studie zeigten Fälle mit einem Verlust von Chromosom 10 eine höhere Inzidenz von Metastasen (58% der Fälle). Im Gegensatz dazu wiesen Tumoren mit einer normalen Anzahl oder gar einem Zugewinn an Chromosom 10 weniger Metastasen auf (28% und 33%). Dies entspricht auch den Ergebnissen einer Studie, die den Verlust von PTEN signifikant mit einer erhöhten Inzidenz von Metastasen korrelierte (Neumann et al. 2013).

Eine weitere Studie zeigte Deletionen von Chromosom 10 in lymphogenen Metastasen und Lebermetastasen beim kolorektalen Karzinom (Knösel et al. 2004). Hierbei wurden die chromosomalen Veränderungen der Lymphknoten- und Lebermetastasen mit denen der Primärtumoren verglichen. Der Verlust von Chromosom 10 beeinflusst die Genkopienanzahl von PTEN und hat dadurch Einfluss auf die Expression des

Genprodukts von PTEN. Diese Ergebnisse decken sich mit denen einer anderen Studie, in der Fernmetastasen einen Verlust von PTEN zeigten, während PTEN in den Primärtumoren weiterhin nachgewiesen werden konnte (Custodio und Feliu 2013). Darüber hinaus wurde von Promoter-Methylierungen und Punktmutationen berichtet, die das PTEN-Gen stilllegen (Molinari und Frattini 2013). Der Verlust der PTEN-Expression korrelierte des Weiteren mit einer Resistenz gegenüber Therapien mit EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren wie Erlotinib beim Glioblastom (Mellinoff et al. 2005), Trastuzumab bei HER2-überexprimierenden Mammakarzinomen (Nagata et al. 2004) und Cetuximab in KRK-Zelllinien (Jhawer et al. 2008).

Neben PTEN könnte auch das PDCD4-Gen einen Einfluss auf das schlechtere Überleben bei Verlust von Chromosom 10 haben. PDCD4 liegt ebenfalls auf Chromosom 10 (10q24) und spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptoseeinleitung geschädigter Zellen. Eine starke Expression von PDCD4 korreliert mit guter Tumorregression nach neoadjuvanter Radiochemotherapie und besserem Gesamtüberleben bei lokal fortgeschrittenem Rektumkarzinom. PDCD4 zählt außerdem zu den Genen, welche infolge einer präoperativer Radiotherapie heraufreguliert werden (Dou et al. 2014). Des Weiteren konnte in einer Untersuchung beim Lungenkarzinom die Herunterregulation von PDCD4 mit schlechter Prognose und Tumorprogress assoziiert werden (Chen et al. 2003).

6. Schlussfolgerungen

Neue Erkenntnisse über die genetische Heterogenität der Tumorzellen hinsichtlich Mutationen oder der Abhängigkeit von Onkogenen, gerade in Bezug auf Primärtumor und Metastasen, sowie die Interaktionen von Signalwegen unterstützen die Forderung nach einer personalisierten Therapie von Tumorerkrankungen. Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Entwicklung individualisierter Risikoprofile und Therapieformen durch Etablierung von molekularen Markern beim kolorektalen Karzinom leisten.

Durch gezielte Auswahl der Patienten könnten die Ansprechraten auf Chemo- und Antikörpertherapien erhöht und unnötige Toxizität sowie Kosten vermieden werden. So könnte die Einbeziehung weiterer molekularer Marker wie Chromosom 10, EGFR, PTEN und BRAF, eventuell in Kombination mit dem Ploidiestatus, zur Therapieentscheidung beitragen. Die Beschränkung auf die KRAS-Mutation als einzig klinisch relevanten Marker scheint in Zukunft nicht mehr gerechtfertigt. Gerade der Verlust von Chromosom 10, zusammen mit der Analyse von PTEN, könnte sich als prädiktiver Marker für Tumorprogress und erhöhte Mortalität etablieren.

Aufgrund der bisher uneinheitlichen Ergebnisse in der Literatur, gerade hinsichtlich der Bedeutung von KRAS-Mutation und Aneuploidie, werden in Rahmen eines Validationsprozesses weitere kontrollierte Studien mit einheitlichem Studiendesign zur Auswirkung von KRAS, BRAF, PTEN, EGFR und Aneuploidie auf die Tumorprognose nötig sein. Besonders die Rolle der Hypodiploidie wurde bisher nur in wenigen Studien beleuchtet. Während dieses Prozesses werden auch technische Fragen zu klären sein, etwa nach kostengünstigen und zuverlässigen Analysemethoden, die in der Routinediagnostik eingesetzt werden können.

Üblicherweise wird die Ploidie von Tumorzellen über die Messung des DNA-Gehalts mit Hilfe von Durchflusszytometrie oder statischer DNA-Analyse bestimmt. Die von uns angewandte Methode der FISH könnte eine interessante Alternative sein, da sie in der Routinediagnostik vieler pathologischer Institute weit verbreitet ist und zusammen mit der Analyse bestimmter Markerchromosomen einen diagnostischen Beitrag leisten könnte. Bisher wird die FISH weniger zur Analyse der Ploidie und damit der Gesamtchromosomenzahl von Tumoren verwendet, sondern eher für die Bestimmung

der Kopienanzahl einzelner Chromosomen, subchromosomaler Regionen oder Gene. Die Analyse der FISH-Signale von HER2/neu beim Mammakarzinom ist bereits ein Routineverfahren zur prädiktiven Beurteilung des Ansprechens auf die HER2-Antikörpertherapie. Der Anteil aneuploider oder nahezu triploider Tumoren unserer FISH-Analyse ähnelte den Daten aus zytometrischen Untersuchungen, was für eine Vergleichbarkeit beider Methoden spricht. Allerdings hat sich sowohl in unserer Arbeit als auch in der Studie von Knösel et al. (2004) gezeigt, dass besonders die Chromosomen 4 und 10 häufig von Verlusten oder Zugewinnen an genetischem Material betroffen waren. Zur reinen Ploidiebestimmung wäre es in diesem Zusammenhang interessant, weitere Chromosomen zu analysieren, die weniger häufig von Aberrationen betroffen sind. Gleichzeitig scheinen bestimmte Gene für die Tumorbilogie von Bedeutung zu sein, so dass auch gezielt chromosomale Regionen mit charakteristischen genetischen Imbalancen analysiert werden sollten.

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adam R, De Gramont A, Figueras J, Guthrie A, Kokudo N, Kunstlinger F, Loyer E, Poston G, Rougier P, Rubbia-Brandt L, Sobrero A, Tabernero J, Teh C, Van Cutsem E, Jean-Nicolas Vauthey of the Eg. 2012. The oncosurgery approach to managing liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus. *Oncologist*, 17 (10):1225-1239.
- Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA. 2013. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2:e71.
- Andreyev H, Norman A, Cunningham D, Oates J, Dix B, Lacopetta B, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins R, Beranek M. 2001. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the "RASCAL II" study. *British Journal of Cancer*, 85 (5):692-696.
- Anjomshoaa A, Nasri S, Humar B, McCall JL, Chatterjee A, Yoon HS, McNoe L, Black MA, Reeve AE. 2009. Slow proliferation as a biological feature of colorectal cancer metastasis. *Br J Cancer*, 101 (5):822-828.
- Araujo RO, Valadao M, Borges D, Linhares E, de Jesus JP, Ferreira CG, Victorino AP, Vieira FM, Albagli R. 2015. Nonoperative management of rectal cancer after chemoradiation opposed to resection after complete clinical response. A comparative study. *Eur J Surg Oncol*, 41 (11):1456-1463.
- Araujo SE, Bernardo WM, Habr-Gama A, Kiss DR, Cecconello I. 2007. DNA ploidy status and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis of published data. *Dis Colon Rectum*, 50 (11):1800-1810.
- Castedo M, Coquelle A, Vivet S, Vitale I, Kauffmann A, Dessen P. 2006. Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *The Embo Journal*, 25 (11):2584-2595.
- Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. 2009. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*, 59 (6):366-378.
- Chen Y, Knosel T, Kristiansen G, Pietas A, Garber ME, Matsushashi S, Ozaki I, Petersen I. 2003. Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis. *J Pathol*, 200 (5):640-646.
- Collado M, Serrano M. 2014. The Senescent Side of Tumor Suppression. *Cell Cycle*, 4 (12):1722-1724.
- Custodio A, Feliu J. 2013. Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: Beyond KRAS mutations. *Crit Rev Oncol Hematol*, 85 (1):45-81.
- Davaadelger B, Shen H, Maki C. 2014. Novel Roles for p53 in the Genesis and Targeting of Tetraploid Cancer Cells. *PLoS One*, 9 (11):1-11.
- Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. Krebsfrüherkennung in Deutschland 2014 - Evidenz, aktueller Standard, Perspektiven. Gesundheitspolitische Schriftenreihe der DGHO Band 4. Berlin 2014.
- Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. 2008. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26 (35):5705-5712.
- Dou X, Wang R-B, Meng X-J, Yan H-J, Jiang S-M, Zhu K-L, Xu X-Q, Chen D, Song X-R, Mu D-B. 2014. PDCD4 as a Predictor of Sensitivity to Neoadjuvant

- Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (2):825-830.
- Giaretti W, Danova M, Geido E, Mazzini G, Sciallero S, Aste H. 1991. Flow Cytometric DNA index in the Prognosis of Colorectal Cancer. *Cancer*, 67 (1):1921-1927.
- Hennig A, Markwart R, Esparza-Franco MA, Ladds G, Rubio I. 2015. Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biol Chem*, 396 (8):831-848.
- Holland AJ, Cleveland DW. 2012. Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. *EMBO Rep*, 13 (6):501-514.
- Jass JR. 2007. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50 (1):113-130.
- Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L, Augenlicht LH, Perez-Soler R, Mariadason JM. 2008. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res*, 68 (6):1953-1961.
- Kishiki T, Ohnishi H, Masaki T, Ohtsuka K, Ohkura Y, Furuse J, Sugiyama M, Watanabe T. 2014. Impact of genetic profiles on the efficacy of anti-EGFR antibodies in metastatic colorectal cancer with KRAS mutation. *Oncol Rep*, 32 (1):57-64.
- Klein M, Azaquoun N, Jensen BV, Gogenur I. 2015. Improved survival with early adjuvant chemotherapy after colonic resection for stage III colonic cancer: A nationwide study. *J Surg Oncol*.
- Knösel T, Schlüns K, Stein U, Schwabe H, Schlag PM, Dietel M, Petersen I. 2004. Chromosomal Alterations during Lymphatic and Liver Metastasis Formation of Colorectal Cancer. *Neoplasia*, 6 (1):23-28.
- Langie SA, Koppen G, Desaulniers D, Al-Mulla F, Al-Temaimi R, Amedei A, Azqueta A, Bisson WH, Brown DG, Brunborg G, Charles AK, Chen T, Colacci A, Darroudi F, Forte S, Gonzalez L, Hamid RA, Knudsen LE, Leyns L, Lopez de Cerain Salsamendi A, Memeo L, Mondello C, Mothersill C, Olsen AK, Pavanello S, Raju J, Rojas E, Roy R, Ryan EP, Ostrosky-Wegman P, Salem HK, Scovassi AI, Singh N, Vaccari M, Van Schooten FJ, Valverde M, Woodrick J, Zhang L, van Larebeke N, Kirsch-Volders M, Collins AR. 2015. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis*, 36 Suppl 1:S61-88.
- Larsson LG. 2011. Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence. *Semin Cancer Biol*, 21 (6):367-376.
- Laubert T, Bente V, Freitag-Wolf S, Voulgaris H, Oberlander M, Schillo K, Kleemann M, Burk C, Bruch HP, Roblick UJ, Habermann JK. 2013. Aneuploidy and elevated CEA indicate an increased risk for metachronous metastasis in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*, 28 (6):767-775.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2014, AWMF Registrierungsnummer: 021-007OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (Stand 05.11.2015 21:45).
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, 368:623-626.
- Li H, Zhu F, Boardman LA, Wang L, Oi N, Liu K, Li X, Fu Y, Limburg PJ, Bode AM, Dong Z. 2015. Aspirin Prevents Colorectal Cancer by Normalizing EGFR Expression. *EBioMedicine*, 2 (5):447-455.

- MacDermid E, Hooton G, MacDonald M, McKay G, Grose D, Mohammed N, Porteous C. 2009. Improving patient survival with the colorectal cancer multi-disciplinary team. *Colorectal Dis*, 11 (3):291-295.
- Mellinhoff IK, Wang M, Vivanco I, Haas-Kogan D. 2005. <Mellinhoff et al. Molecular determinants of response of glioblastomas to EGFR targeted therapy.pdf>. *NEJM*, 353 (19):2012-2024.
- Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppede F. 2011. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol*, 2011:792362.
- Mitelman, F., Johansson, B. and Mertens, F. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. 2015.
<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman> (Stand 01.11.2015 11:36)
- Molinari F, Frattini M. 2013. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol*, 3:326.
- Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, Salido M, Gallen M, Marsters S, Tsai SP, Minoche A, Seshagiri S, Serrano S, Himmelbauer H, Bellmunt J, Rovira A, Settleman J, Bosch F, Albanell J. 2012. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med*, 18 (2):221-223.
- Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D. 2004. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*, 6 (2):117-127.
- Neumann J, Wehweck L, Maatz S, Engel J, Kirchner T, Jung A. 2013. Alterations in the EGFR pathway coincide in colorectal cancer and impact on prognosis. *Virchows Arch*, 463 (4):509-523.
- Neumann JH, Jung A, Kirchner T. 2015. Molecular pathology of colorectal cancer. *Pathologe*, 36 (2):137-144.
- Nitsche U, Rosenberg R, Balmert A, Schuster T, Slotta-Huspenina J, Herrmann P, Bader FG, Friess H, Schlag PM, Stein U, Janssen KP. 2012. Integrative marker analysis allows risk assessment for metastasis in stage II colon cancer. *Ann Surg*, 256 (5):763-771; discussion 771.
- Popat S, Hubner R, Houlston RS. 2005. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*, 23 (3):609-618.
- Rajagopalan H, Lengauer C. 2004. Aneuploidy and cancer. *Nature*, 432 (7015):338-341.
- Razis E, Pentheroudakis G, Rigakos G, Bobos M, Kouvatsas G, Tzaida O, Makatsoris T, Papakostas P, Bai M, Goussia A, Samantas E, Papamichael D, Romanidou O, Efstratiou I, Tsolaki E, Psyrri A, De Roock W, Bafaloukos D, Klouvas G, Tejpar S, Kalogerias KT, Pectasides D, Fountzilas G. 2014. EGFR gene gain and PTEN protein expression are favorable prognostic factors in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Cancer Res Clin Oncol*, 140 (5):737-748.
- Ren J, Li G, Ge J, Li X, Zhao Y. 2012. Is K-ras gene mutation a prognostic factor for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Dis Colon Rectum*, 55 (8):913-923.
- Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. Ausgabe. Berlin 2013.
- Russo A, Bazan V, Agnese V, Rodolico V, Gebbia N. 2005. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies. *Ann Oncol*, 16 Suppl 4:iv44-49.

- Rustgi AK. 2007. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*, 21 (20):2525-2538.
- Schimmelpenning H, Habermann J, Krüger S, Roblick UJ, Stange E, Ludwig D, Kujath P, Broll R, Auer G, Bruch HP. 2000. Das Colitis ulcerosa-assoziierte kolorektale Karzinom-DNS-Ploidie als Indikator einer drohenden malignen Transformation. *Zentralblatt für Chirurgie*, 125:880-887.
- Schulze S, Petersen I. 2011. Gender and ploidy in cancer survival. *Cell Oncol (Dordr)*, 34 (3):199-208.
- Seth R, Crook S, Ibrahim S, Fadhil W, Jackson D, Ilyas M. 2009. Concomitant mutations and splice variants in KRAS and BRAF demonstrate complex perturbation of the Ras/Raf signalling pathway in advanced colorectal cancer. *Gut*, 58 (9):1234-1241.
- Shen Z. 2011. Genomic instability and cancer: an introduction. *J Mol Cell Biol*, 3 (1):1-3.
- Singh A, Greninger P, Rhodes D, Koopman L, Violette S, Bardeesy N, Settleman J. 2009. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell*, 15 (6):489-500.
- Soh J, Okumura N, Lockwood WW, Yamamoto H, Shigematsu H, Zhang W, Chari R, Shames DS, Tang X, MacAulay C, Varella-Garcia M, Vooder T, Wistuba, II, Lam S, Brekken R, Toyooka S, Minna JD, Lam WL, Gazdar AF. 2009. Oncogene mutations, copy number gains and mutant allele specific imbalance (MASI) frequently occur together in tumor cells. *PLoS One*, 4 (10):e7464.
- Staarmann J, Kotb WA, Petersen I. 2015. DNA ploidy and morphology of colon tumors in the adenoma-carcinoma sequence. *Folia histochemica et cytobiologica*.
- Steckel M, Molina-Arcas M, Weigelt B, Marani M, Warne PH, Kuznetsov H, Kelly G, Saunders B, Howell M, Downward J, Hancock DC. 2012. Determination of synthetic lethal interactions in KRAS oncogene-dependent cancer cells reveals novel therapeutic targeting strategies. *Cell Res*, 22 (8):1227-1245.
- Vivanco I, Sawyers CL. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2 (7):489-501.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton S, Scott EK, Preisinger A, Leppert M, Smits A, Bos J. 1988. Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N Engl J Med*, 319 (9):525-532.
- Walther BM, Walther I, Chen Y, Petersen I. 2014a. GNAS1 mutation analysis in gastrointestinal tumors. *Folia histochemica et cytobiologica*, 52 (2):90-95.
- Walther I, Walther BM, Chen Y, Petersen I. 2014b. Analysis of GNAS1 mutations in myxoid soft tissue and bone tumors. *Pathol Res Pract*, 210 (1):1-4.
- Weinstein IB. 2002. Addiction to Oncogenes - The Achilles Heal of Cancer. *Science*, 297 (5578):63-64.
- Yamazoe Y, Maetani S, Nishikawa T, Onodera H, Tobe T, Imamura M. 1994. The prognostic role of the DNA ploidy pattern in colorectal cancer analysis using paraffin-embedded tissue by an improved method. *Surgery Today*, 24 (1):30-36.

8. Anhang

8.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. Annelore Altendorf-Hofmann, Dr. med. Yuan Chen, Dipl.-Biol. Cornelius Wölfel, Prof. Dr. med. Iver Petersen,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 12. November 2016

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

8.2 Danksagung

Das Erstellen einer wissenschaftlichen Arbeit ist nie das Werk eines Einzelnen. Deshalb ist es jetzt an der Zeit, all denen, die mir während dieser Zeit geholfen haben, meinen Dank auszusprechen.

Herrn Prof. Dr. Iver Petersen danke ich für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas, für seine hilfreiche, kompetente Unterstützung und anregenden Ratschläge, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Annelore Altendorf-Hofmann für ihre intensive und außerordentlich warmherzige Betreuung in jeder Phase meiner Arbeit. Ihre praktischen Anregungen und unermüdliche Ermutigung kann ich nicht hoch genug schätzen.

Bei Frau Dr. Yuan Chen möchte ich mich für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und Bereitstellung der PCR-Analyse herzlich bedanken.

Herrn Dr. Klaus Bickel, Herrn Dr. Hans-Joachim Schulz und Herrn Dr. Thomas Meier danke ich für die freundliche Bereitstellung der Tumorproben und Hilfe bei der Erhebung klinischer Daten.

Nicht zuletzt danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Jena, insbesondere Frau Christiane Geier und Frau Angela Gröbner für ihre Hilfe bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.

Ganz herzlich möchte ich auch Herrn Dipl.-Biol. Cornelius Wölfel Dank sagen für die geduldige Einführung in die wissenschaftliche Methode der FISH.